Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. F r a n k e

KLINISCHE ANWENDUNG DER DMSO/DISK-ELEKTROPHORESE

ERFAHRUNGEN MIT SEREN VON GESUNDEN UND LEBERPATIENTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Eberhard Pfeuffer

Würzburg

Würzburg 1970

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. F r a n k e

KLINISCHE ANWENDUNG DER DMSO/DISK-ELEKTROPHORESE

ERFAHRUNGEN MIT SEREN VON GESUNDEN UND LEBERPATIENTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Eberhard Pfeuffer

Würzburg

Würzburg 1970

Referent: Prof. Dr. med. H. F r a n k e

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Promotion:

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER DISK-ELEKTROPHORESE NACH ORNSTEIN UND DAVIS (1964)	3
	1. Der Konzentrierungseffekt	3
	2. Der Molekularsiebeffekt	4
III.	FRAGESTELLUNG	5
IV.	METHODIK	5
	A. Apparatur	5
	B. Chemikalien - unter besonderer Berücksichtigung von Polyacrylamid und Dimethylsulfoxid (DMSO)	8
	C. Versuchsanordnung	12
	a) Allgemeines Arbeitsverfahren	12
	b) Vorversuche	15
	c) Hauptversuche	17
V.	ERGEBNISSE	19
	A. Methodische Vereinfachung	19
	B. Anzahl und Schärfe der Banden	19
	C. Neue Banden	29
	D. Diagnostische Aussagemöglichkeit	29
	1) Beschreibung von Pherogrammen von Normalseren	29
	2) Beschreibung von Pherogrammen von pathologischen Seren bei	
	a) viraler Hepatitis	32
	b) allgemeinem Leberparenchymschaden	33
	c) Leber-Zirrhose	35
	d) Fettleber	36

Seite

VI. DISKUSSION 39

VII. ZUSAMMENFASSUNG 44

VIII. LITERATURVERZEICHNIS I - IV

I. EINLEITUNG

Die Eiweißforschung der letzten 25 Jahre konnte durch die Entwicklung ständig verbesserter Isolierungs- und Nachweisverfahren große Fortschritte verzeichnen. Da die Proteine eine zentrale Stellung im Stoffwechsel einnehmen, ist auch in der Klinik die Anwendung analytischer Verfahren für Diagnostik und Therapiekontrolle von großer Bedeutung. Zu einer beherrschenden Methode in der Analytik der Proteine ist die Elektrophoresetechnik geworden. (2).

Obgleich schon von TISELIUS 1937 die Bedeutung der elektrophoretischen Serumanalyse für die klinische Diagnostik erkannt worden war, hat erst viele Jahre später die mit geringem Aufwand durchführbare Papierelektrophorese als Routinemethode Eingang in das klinische Laboratorium gefunden. Da aber der diagnostischen Aussagekraft der Papierelektrophorese wegen der geringen Auflösung in nur fünf Proteinfraktionen Grenzen gesetzt sind, suchte man die Trennleistung durch methodische Variationen und Anwendung verschiedener Trägermaterialien zu erhöhen. So erhielt KOHN (20) z.B. mit der von ihm beschriebenen Acetatfolienelektrophorese 6 - 8 Fraktionen. Aber erst die Einführung der Immunelektrophorese im Jahre 1953 durch GRABAR und WILLIAMS (15 a) gestattete eine wesentlich verbesserte Auftrennung und damit auch dataillliertere diagnostische Möglichkeiten. Fast gleichzeitig berichtete SMITHIES über die Anwendung von Stärkegel als Trägermaterial für elektrophoretische Trennung(35).Mit diesem Verfahren konnten bis zu 20 Fraktionen im Serumproteingemisch isoliert werden. 1959 benützten schließlich RAYMOND und WEINTRAUB (30) Acrylamid als Trägersubstanz für die Elektrophorese. Die Verwendung dieses Gels in der sog. Disk-Elektrophorese nach ORNSTEIN (26) und DAVIS (9) (1964) ermöglicht eine Auftrennung in 20 und mehr scharf begrenzte und quantitativ erfaßbare Komponenten.

Die Fortschritte durch diese verschiedenen Elektrophoresemethoden auf dem Gebiet der Proteincharakterisierung in den letzten Jahren lassen sich kurz folgendermaßen zusammenfassen:
Bis Ende der vierziger Jahre war lediglich eine Differenzierung in die fünf sog. klassischen Fraktionen möglich. Heute dagegen ist eine Auflösung unter Verwendung engmaschiger Trägermedien in mehr als 20 Komponenten auch in der Klinik zu erreichen. Die vielfältigen elektrophoretischen Verfahren schließen sich aber gegenseitig nicht aus.

Da sie sich alle durch bestimmte Vor- und Nachteile auszeichnen, sind sie mehr als Ergänzungsverfahren zu der allgemein angewandten Papierelektrophorese zu verstehen.

Trotz dieser Leistungsfähigkeit moderner elektrophoretischer Analysemethoden sind die Kenntnisse über die Serumeiweißformel auch heute noch rein empirisch. Die genaue Bedeutung der pathologischen Veränderungen des Eiweißbildes ist in vielen Fällen nicht bekannt (RIVA (32)). Im Laufe der Jahre haben sich als Ergebnis ausgedehnter vergleichender Untersuchungen über die Bluteiweißkörper einige Reaktionskonstellationen ergeben. So sind unzählige klinische Arbeiten erschienen, die sich mit den bei verschiedensten Krankheiten auftretenden spezifischen Verschiebungen im Elektropherogramm des Serums beschäftigen (WUHRMANN u. MÄRKI (38); RIVA (32); DITTMER (10); WUNDERLY (39) u.a.). Die dort beschriebenen Reaktionstypen bieten dem Arzt wertvolle Anhaltspunkte für Diagnostik und Therapiekontrolle.

Die Bedeutung der Elektrophorese läßt demnach den Versuch, die Methode ständig zu verbessern, nicht nur gerechtfertigt, sondern sogar notwendig erscheinen.

II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER DISK-ELEKTROPHORESE NACH ORNSTEIN UND DAVIS (1964)

Von allen heute bekannten elektrophoretischen Analysemethoden erscheint die Disk-Elektrophorese wegen vieler Vorteile besonders erfolgversprechend. ORNSTEIN und DAVIS beschrieben dieses Verfahren erstmals 1959 und verbesserten es in den folgenden Jahren. (9, 26).

Prinzip:

Die Disk-Elektrophorese benützt als Träger kleine Polyacrylamid-Säulchen, die in der üblichen Form aus drei Teilen bestehen:

1.) Ein großporiges Substanz- oder Antikonvektions-Gel, das die aufzutrennenden Proteine enthält;
2.) ein großporiges Sammelgel, in welchem die Proteine konzentriert werden;
3.) ein kleinporiges Trenngel, in welchem schließlich die Trennung stattfindet.

Die Methode hat ihren Namen - außer von den zufällig scheibenförmigen Zonen - von dem d i s k o n t i n u i e r l i c h e n Trennsystem (verschiedene Porengröße im Gel, pH-Wert- und Puffer-Wechsel zwischen Elektrodenlösung, Sammel- und Trenngel). Alle diese aufeinander abgestimmten Diskontinuitäten erzeugen nach ORNSTEIN die für die Schärfe der Trennung entscheidende hochkonzentrierte Startzone. Dabei wird durch eine Kombination folgender beider physikalischer Faktoren ein ungewöhnlich hohes Auflösungsvermögen erreicht:

1. Der Konzentrierungseffekt:

Durch die geeignete Wahl von sog. Folge- und Leit-Ionen, die während der Elektrophorese in Trennrichtung vor bzw. hinter den Proteinen im Sammelgel wandern, erfolgt eine Konzentrierung der Proteinezone in mikro-dünne Scheibchen bereits vor der eigentlichen Trennung. Erreicht das Proteingemisch, eingezwängt zwischen Folge- und Leit-Ionen, die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel, so gewinnen die Ionen durch den pH-Wert- und Porengröße-Wechsel an Beweglichkeit und wandern den Proteinen voraus. Die Proteine bewegen sich dann im Trenngel als scharf begrenzte Startzone in einem Gebiet einheitlicher Feldstärke und unterliegen einer echten Zonenelektro-

phorese. (Genaue Beschreibung siehe ORNSTEIN (26)).

2. Der Molekularsiebeffekt:
Im Trenngel erfolgt eine Auftrennung der konzentriert vorliegenden Proteine nicht nur nach der Gesamtladung, sondern auch nach der Größe und Gestalt der Moleküle. Diese schon bei der Stärkegel- und kontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese angewandte Kombination zweier Trennprinzipien erlaubt eine gegenüber der Papierelektrophorese wesentlich verbesserte Auflösung. Das "Aussieben" der Teilchen nach ihrer Molekülgröße durch das Gelgitternetz - von BERMES u. Mc DONALD (1) als „barriereffect" bezeichnet - erklärt auch den Befund, daß die großen α_2-Globuline eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit als die vergleichsweise kleineren β-Globuline haben. Aus diesem Grund sind auch die einzelnen Banden der Disk-Elektrophorese nicht ohne weiteres dem Papierelektropherogramm zuzuordnen (vergleiche Abb. 3).

Durch die Kombination dieser beiden Effekte - Konzentrierungs- und Molekularsiebeffekt - übertrifft die Disk-Elektrophorese die bisher üblichen Verfahren im Auflösungsvermögen und in der Trennschärfe. Sie hat sich, wie viele neuere Arbeiten beweisen, in den Forschungslaboratorien einen bereits bedeutenden Platz gesichert. Die recht komplizierte Methodik gestattet bis heute aber keine Routineuntersuchungen. Eine vereinfachte Methodik bei etwa gleichwertiger Trennschärfe wäre deshalb besonders für die Klinik wünschenswert.

III. FRAGESTELLUNG

Die vor der oben beschriebenen Disk-Elektrophorese gebräuchlichen Methoden (Papier-, Immuno- und Stärkegel-Elektrophorese) gehen davon aus, daß ein in seiner Porengröße unveränderlicher Träger als Weg während der Trennung von Proteinen dient.

Die Fortentwicklung der Kunststoffchemie verschafft jetzt zusätzlich die Möglichkeit, die Faserdichte des Trägers durch gezielte Polymerisationsbedingungen beliebig zu variieren. Damit erhält auch die Klinik über die bisherige Ultrazentrifugentrennung hinaus Möglichkeiten, im Serum vorkommende Proteine und proteingebundene Stoffe verschiedenster Molekülgröße mit einfachen Mitteln zu trennen.

Das Verfahren der Disk-Elektrophorese (siehe obige Beschreibung) war bisher für den klinischen Gebrauch allzu kompliziert. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb versucht werden, durch Anwendung eines stark polaren Lösungsmittels als Pufferbestandteil im Gel das Verfahren zu vereinfachen und dadurch als Methode für klinisch-chemische Untersuchungen zu erschließen.

IV. METHODIK

Da es sich um eine modifizierte Methode handelt, ist es notwendig, die Methode ausführlich zu beschreiben.

A. Apparatur:

Die apparative Ausrüstung zur Durchführung der Disk-Elektrophorese ist einfach. Wir benützen dabei eine Apparatur, wie sie grundsätzlich ähnlich von BLOEMENDAL (3, 5), DAVIS (9), SCHLEYER u. SCHAIBLE (34) und anderen entworfen wurde. Sie besteht im wesentlichen aus einer bestimmten Anzahl von zylindrischen Röhrchen - in unserem Falle aus sechs -, einem Röhrchenhalter und aus zwei Elektrodengefäßen. Alle unsere Geräte sind aus Plexiglas hergestellt.

a) Gelröhrchen:

Die Röhrchen dienen zur Aufnahme des Polyacrylamidgels sowohl bei der Polymerisation als auch bei der Elektrophorese. Sie sind 12 cm lang und haben einen inneren Durchmesser von 0,6 cm.
Diese Dimensionen sind nach DAVIS (9) am günstigsten, da sie eine optimale Kombination für das Konzentrieren und Trennen der Proteine ergeben. Zur besseren Ableitung der bei der Elektrophorese entstehenden Joule'schen Wärme ist die äußere Oberfläche eines jeden Röhrchens durch mehrere vorspringende Längsleisten vergrößert.
Nach FASOLD bestehen unsere Röhrchen aus jeweils zwei zusammengesetzten Röhrchenhälften. Dies vereinfacht vor allem die Entnahme des Gels nach der Elektrophorese aus den Röhrchen.

b) Röhrchenhalter:

Zum Füllen der Röhrchen mit der noch nicht polymerisierten Gelflüssigkeit verschließt man sie an ihrem unteren Ende mit stramm sitzenden Gummikappen. Zweckmäßig bringt man diese auf einer planen Plexiglasplatte an, damit die senkrechte Stellung der Gelröhrchen während des Polymerisationsvorgangs genau beibehalten wird.

c) Elektrodengefäße:

Die beiden zylindrischen Elektrodengefäße bestehen aus einem als Anodenraum dienenden Standgefäß (Höhe 12,5 cm; Durchmesser 9 cm) und einem aufgesetzten Kathodenraum (Höhe 3,5 cm; Durchmesser 9 cm). Als Elektrode dient jeweils ein auf dem Boden angebrachter Platindraht. Der Boden des Kathodenraumes enthält in kreisförmiger Anordnung eine Reihe von sechs leicht konischen Bohrungen für die Aufnahme der Polyacrylamid-Gel-Röhrchen. Durch diese Bohrungen werden die Röhrchen vor der Durchführung der Elektrophorese soweit mit einer Gummidichtung von unten her eingedreht, daß sie fest und absolut dicht abschließen. Während des Versuches stehen Kathoden- und Anodenraum nur über die Gelröhrchen in Verbindung. (Abb. 1).

Da das Kathodengefäß dem Anodengefäß fest aufsitzt, entwickelte sich in dem abgeschlossenen Raum über dem Anodenpuffer bei der Elektrophorese eine nicht unerhebliche Joule'sche Wärme. Um eine bessere Ableitung dieser Wärme zu ermöglichen, wurden nachträglich

in die oberen Wandteile des Anodengefäßes fünf etwa fünfmarkstückgroße Löcher gebohrt.

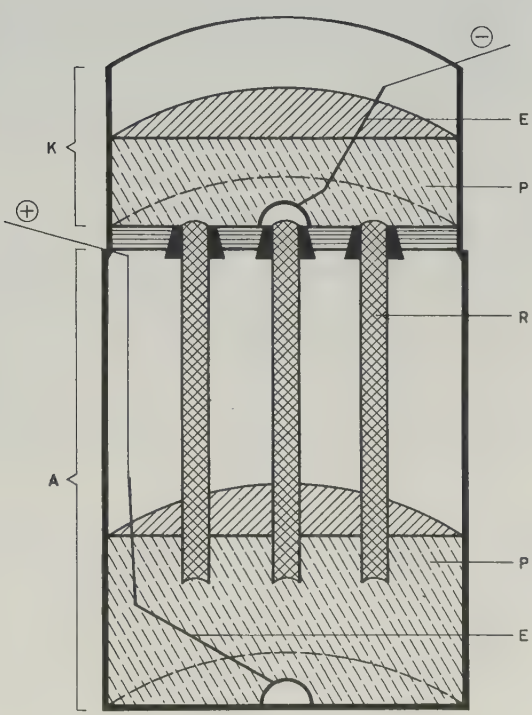


Abb. 1) Disk-Elektrophoresegerät aus Plexiglas
(modifiziert nach BLOEMENDAL (3))

K = Kathodenraum
A = Anodenraum (Standgefäß) -
beide mit Elektrodenpuffer (P) angefüllt -
R = Gelröhrchen mit Polyacrylamidgel
E = Platinelektroden

Diese Apparatur kann nach DAVIS (9) im einfachsten Falle aus zwei im Warenhaus erhältlichen Plastikdosen selbst angefertigt werden. Sie ermöglicht es, je nach Anzahl der Bohrungen im Boden des Kathodengefäßes die Anzahl der Gelröhrchen und damit der einzelnen Elektrophoresen in einem Versuchsablauf noch wesentlich zu erhöhen.

Ein wegen seiner Kapazität von 72 Gelröhrchen für Routinezwecke besonders günstiges Gerät beschrieb MATSON (24).

B. Chemikalien:

a) Polyacrylamid:

Das Polyacrylamid-Gel ist ein Polymerisations- und Vernetzungsprodukt aus Acrylsäureamid und einem Vernetzer, meist N,N'-Methylenbisacrylsäureamid. Das dreidimensionale Maschenwerk des Gels bildet sich durch Vernetzung nebeneinander wachsender Polyacrylamidketten, die nach der Art der Vinyl-Polymerisation entstehen. N,N'-Methylenbisacrylamid verbindet dabei die Polymerisationsknäuel durch Hauptvalenzen. Dadurch wird eine geeignete Viskosität, Elsatizität und Festigkeit des Gels erreicht.

A c r y l s ä u r e a m i d , $CH_2 = CH - CO - NH_2$, wurde erstmals 1893 von MOUREAU hergestellt und beschrieben (7). RAYMOND und WEINTRAUB benützten das Polymerisationsprodukt erstmals 1959 als Träger für die Elektrophorese (30). Seitdem bemühten sich vor allem DAVIS (9) und ORNSTEIN (26) u.a. um ein für das Gel möglichst günstiges Mischungsverhältnis von Acrylsäureamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Heute sind diese beiden Substanzen bereits gemischt als Cyanogum 41 im Handel.

Gegenüber allen bisher üblichen Trägermedien der Elektrophorese weist das Polyacrylamidgel sehr wesentliche Vorteile auf (4, 7, 25, 30, 31):
Die Dichte des Gitterwerkes und damit die Porengröße läßt sich über einen weiten Bereich variieren. Durch diese Möglichkeit der Änderung seiner Struktur zur Erzeugung gezielter Porenweite ist es möglich, je nach Molekülgröße der aufzutrennenden Eiweißkörper den günstigsten Molekularsiebeffekt zu erreichen. Da sich das Gel als synthetisches Polymerisationsprodukt außerdem aus chemisch definier-

ten Grundstoffen relativ hohen Reinheitsgrades zusammensetzt, ist seine Herstellung im Gegensatz zu der von SMITHIES 1955 eingeführten Stärkegel-Elektrophorese (35) stets reproduzierbar. Ferner ist es durch seine chemische Stabilität und Indifferenz gegenüber pH-Wert- und Temperatur-Veränderungen relativ unempfindlich. Während z.B. Agar-Gel als saures Polysaccharid in Gegenwart alkalischer Pufferlösungen elektroosmotische Strömungen zeigt, gestattet Polyacrylamid eine Anwendung bei verschiedensten Trennproblemen ohne diesen Nachteil. Seine glasklare Transparenz ermöglicht eine genaue Registrierung und quantitative Auswertung der angefärbten Eiweißfraktionen. Schließlich erlaubte uns seine Unlöslichkeit in den meisten Lösungsmitteln die Anwendung der Polyacrylamid-DMSO-Elektrophorese.

Bei all diesen Vorteilen ist seine Herstellung besonders in den vorher beschriebenen Gel-Röhrchen relativ einfach.

b) Katalysatoren:

Zur Polymerisation von Polyacrylamid-Gel für die Elektrophorese werden gewöhnlich bestimmte Katalysator-Redoxsysteme verwendet. Wir benützten dazu folgende Chemikalien: Riboflavin, Ammoniumperoxydisulfat und das tertiäre aliphatische Amin TEMED (N, N, N', N' -Tetramethylaethylendiamin). Dabei dient Riboflavin mit TEMED als Photokatalysatorsystem unter UV-Licht, während Ammoniumperoxydisulfat mit TEMED auch ohne weitere Hilfsmittel die Polymerisation beschleunigt. Riboflavin wird zur Herstellung des Sammel-Gels benützt, da photokatalysierte Gele nach DAVIS (9) im Vergleich zu peroxydkatalysierten Gelen größere Poren aufweisen.

c) $K_3Fe(CN_6)$:

$K_3Fe(CN_6)$ hat wie alle feinverteilten Metalle und wie molekularer Sauerstoff die Eigenschaft, den Polymerisationsvorgang von Polyacrylamid zu verlangsamen. Dadurch lassen sich weit besser reproduzierbare Gele und standardisierte Polymerisationszeiten erreichen.

d) Pufferlösungen:

Über die von uns verwendeten Pufferlösungen siehe unter Vorversuche.

e) Dimethylsulfoxid (DMSO)

(Seine Wirkung auf Proteinmoleküle und seine Anwendung bei der Elektrophorese):

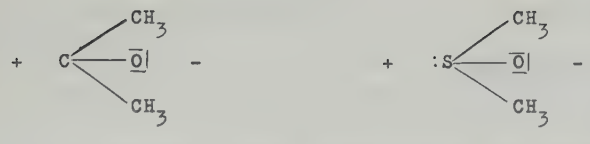
(Die folgenden Angaben sind einer Arbeit von MAIWALD u. REGNAT (22) entnommen)

Ungenützt für die Elektrophorese blieb bisher die Erfahrung, daß Proteine polare organische Stoffe anzulagern und so ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld zu ändern vermögen.

In der präparativen Eiweißchemie bedient man sich stark polarer Lösungsmittel (z.B. Azeton) zur Eiweißfällung. Das Azeton besitzt eine starke Affinität zu Wasser. Bei Einbringen gelöster Eiweißkörper in einen Azetonüberschuß werden die Proteine durch das Lösungsmittel ihres Wassermantels beraubt, erfahren dadurch eine Änderung ihrer Löslichkeit und flocken aus. Die Fällung ist nur mit einem Überschuß an Azeton zu erreichen. Bei Überwiegen des wässrigen Milieus reicht das Wasserbindungsvermögen einer geringeren Azetonmenge nicht aus; die Eiweißkörper behalten ihren Wassermantel und bleiben deshalb in gelöstem Zustand. Fällung von Eiweiß mit polaren Lösungsmitteln ist also, soweit sie durch Dehydratation geschieht, eine Frage der Mengen. Dabei treten Eiweiß und Lösungsmittel in Konkurrenz um die vorhandenen Wassermoleküle. Wesentlich ist festzustellen, daß eine geringe Menge Azeton zwar nicht in der Lage ist, gelöste Eiweißkörper zu fällen, jedoch durch Anlagerung an den Wassermantel der Proteine die elektrostatische Ladung der Eiweißmoleküle ändert und so deren Beweglichkeit in einem elektrischen Feld beeinflußt.

Azeton eignet sich infolge seines niedrigen Kochpunktes nicht als Pufferzusatz für die Elektrophorese, da es während des Trennvorganges infolge der entstehenden Joule'schen Wärme verdunsten würde.

Ein anderes polares Lösungsmittel, das Dimethylsulfoxid (DMSO), ist für diesen Zweck jedoch brauchbar. Als dipolarer, aprotonischer Stoff verfügt DMSO über einen weiten Bereich des flüssigen Aggregatzustandes, über eine hohe Elektronendonatorkapazität und eine starke Polarität. Darauf beruhen seine Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung und sein ausgezeichnetes Lösungsvermögen (23).



A z e t o n D M S O

Das pyramidenförmige Molekül, in seinem sterischen Aufbau dem des Azeton ähnlich, hat zwei Acceptorstellen: das Sauerstoffatom als den Ort der höchsten Elektronendichte und das Schwefelatom, dem trotz des partiell positiven Charakters auf Grund des freien Elektronenpaares noch nucleophile Eigenschaften zukommen. Die Polarität der S=O-Bindung bedingt die große Dielektrizitätskonstante in Flüssigkeiten, zugleich auch das Bindungsvermögen für Wasser. Ein DMSO-Molekül vermag zwei Wasserstoffmoleküle zu binden. Infolge der wesentlich stärkeren Polarität ist die Festigkeit der entstehenden Wasserstoffbrücken dabei größer als bei Azeton, welches infolge geringerer Polarität seiner Moleküle die Eigenschaften des DMSO in abgeschwächter Form besitzt.

DMSO erstarrt bei -18 Grad Celsius und siedet bei + 189 Grad Celsius unter Normalbedingungen. Deshalb ist es als Zusatz zu Elektrophorese-Puffern brauchbar.

Wegen seines Vermögens, in sich Glas, Wasser, alle gebräuchlichen Lösungsmittel und auch makromolekulare Verbindungen gut zu lösen, findet DMSO in verschiedenen Industriezweigen als Lösungsmittel und Lösungsvermittler Verwendung. Seine rasche Penetrationsfähigkeit durch lebendes Gewebe hat dem Mittel in den vergangenen 5 Jahren auch klinische Bedeutung verschafft. Es beschleunigt die percutane Resorption von Arzneimitteln, fördert den intracutanen Transport niedermolekularer Substanzen, nicht zuletzt hat es eine gute analgetische Wirkung. (21).

Zusammenfassend sind folgende Eigenschaften für die Verwendung von DMSO als Pufferzusatz wesentlich: DMSO hat gegenüber dem Azeton den Vorzug stärkeren Wasserbindungsvermögens und einer stärkeren elektrostatischen Wirksamkeit auf die Ladung der Eiweißmoleküle. Nicht zuletzt ist es der relativ hohe Kochpunkt, welcher eine wichtige Bedingung für die Brauchbarkeit des polaren Lösungsmittels darstellt. Wenn DMSO als Füllungsmittel verwendet wird, wirkt es ähnlich schonend wie Azeton auf Eiweißkörper ein. Die Präzipitation derselben durch Dehydratation hat keine Veränderung der Proteinstruktur zur Folge. Deshalb bleiben mit DMSO behandelte bzw. gefällte Eiweißkörper immunologisch verwendbar.

C. Versuchsanordnung:

a) Allgemeines Arbeitsverfahren

1) Gelbereitung

(Die Gelbereitung erfolgte zunächst unter einigen Veränderungen (z.B. pH-Änderung und Verzicht auf Harnstoffzusatz) weitgehend nach GESTELAND u. STAEKELIN (14))

Für die Herstellung des eigentlichen Trenngels benützten wir folgende Lösungen:

A. 2,o ml TEMED und 47 ml 0,1 n Glycin-NaOH-Puffer vom pH 8,6. (Die Lösung wurde mit konzentrierter HCl auf den pH-Wert 8,6 eingestellt).

B. 6,75 g Cyanogum 41 und 50 ml 0,1 n Glycin-NaOH-Puffer vom pH-Wert 8,6.

C. 56 mg Ammoniumperoxydisulfat in 5 ml 0,1 n Glycin-NaOH-Puffer vom pH-Wert 8,6.

Diese Lösungen werden im Verhältnis 1 Teil A + 6 Teile B + 1 Teil C vorsichtig gemischt und sofort anschließend in die vorher beschriebenen senkrecht stehenden Gelröhrchen bis etwa 2 cm unter den oberen Rand eingefüllt. Darüber wird etwas Wasser geschichtet, um eine möglichst plane Oberfläche des Trenngels zu erreichen. Nach ca. 10 Min. zeigt sich die beginnende Polymerisation durch opalisierende Eintrübung des Gels. Nach einer Stunde wird vorsichtig das übergeschichtete Wasser abgegossen.

Nun wird das großporige Sammelgel aus folgenden Lösungen bereitet:

D. 0,23 ml TEMED und 49 ml 0,1 n Glycin-NaOH-Puffer vom pH 8,6 (mit konz. HCl auf pH 8,6 einstellen).

E. 3,12 g Cyanogum 41 in 50 ml 0,1 n Glycin-NaOH-Puffer vom pH-Wert 8,6.

F. 1 mg Riboflavin in 50 ml 0,1 n Glycin-NaOH-Puffer vom pH-Wert 8,6.

Die Lösungen werden im Verhältnis 1 Teil D + 4 Teile E + 1 Teil F gemischt und bis ca. 0,7 - 1,0 cm unter den oberen Rand des Gelröhrchens auf das Trenngel eingefüllt. Auch darauf wird anschließend etwas Wasser geschichtet. Nun werden die Gelröhrchen zur

Polymerisation des Sammelgels ca. 50 - 60 Min. unter eine starke UV-Lampe gestellt.

Sowohl bei der Herstellung des Trenn- als auch des Sammelgels ist auf ein möglichst sorgfältiges, aber auch schnelles Mischen und Einfüllen zu achten. Dadurch wird die Berührung der Gel-Lösungen mit molekularem Sauerstoff, der die Polymerisation hemmt, nach Möglichkeit verhindert. Zu vermeiden sind auch Luftblasen im Gel oder an der Röhrchenwand, die man eventuell durch vorsichtiges Klopfen an die Röhrchen noch vor der Polymerisation der Lösungen entfernen kann.

Mit Ausnahme der Lösung C, die jeweils frisch angesetzt werden muß, sind alle anderen Lösungen des Trenn- und Sammelgels lichtgeschützt bei 4° C längere Zeit haltbar. Bei älteren Lösungen ist jedoch immer der pH-Wert zu überprüfen, da dieser sich infolge Hydrolyse ändern kann.

2) Auftragen des Serums

Nach der Polymerisation des Sammelgels gießt man die überstehende Wasserschicht ab und entfernt rückbleibende Tröpfchen mit einem Docht aus Filterpapier. Auf die nun möglichst plane und trockene Oberfläche des Sammelgels trägt man eine dünne Schicht Stärke auf. Sie ersetzt in einfacher Weise das von ORNSTEIN (26), DAVIS (9) und anderen benutzte Substanz- oder Antikonvektionsgel. Zusätzlich ist diese Methode für das Proteingemisch schonender. Die Dicke der Stärkeschicht wird so bemessen, daß sie die mit einer Lambda-Pipette gleichmäßig aufgetragene Serummenge gerade aufsaugt. Sephadex erwies sich in unseren Versuchen nicht so geeignet wie Stärke. Durch sein starkes Quellvermögen ergeben sich auch bei Verwendung kleinster Mengen zu breite Startzonen für die Proteine.

3) Vorbereitung zur Elektrophorese

Die auf diese Art präparierten Gelröhrchen werden nun vorsichtig (wie früher schon beschrieben) mit einer Dichtung in die Bohrungen des Kathodengefäßbodens von unten her eingesteckt. Anschließend wird soviel Elektrodenflüssigkeit in das Anodengefäß gegeben, daß die Gelröhrchen circa 2 cm eintauchen. Im Kathodengefäß werden die Gelröhrchen mit dem Elektrodenpuffer überschichtet und das Gefäß auf ungefähr 5 - 6 cm aufgefüllt. Dabei ist sorgfältig darauf zu

achten, daß die Stärke-Serumschicht sich nicht mit dem überstehenden Puffer vermischt. Luftblasen am oberen und unteren Röhrchenende müssen abgesaugt werden.

4) Durchführung der Elektrophorese

Man verbindet nun die Elektroden mit dem Gleichstromnetzgerät und stellt die Stromstärke für die ersten zwei Minuten auf 1 m A pro Gel-Röhrchen, dann für 5 Stunden auf 5 m A pro Gel-Röhrchen ein. Anfangs benutzten wir zur Auftrennung der Proteine nach BLOEMENDAL (3) nur 2,4 m A pro Gel-Röhrchen. Dadurch benötigten wir aber sehr lange Trennzeiten (10 Stunden). Eine wesentliche Änderung der Auftrennung und Schärfe der einzelnen Banden bei den verschiedenen Stromstärken und Trennzeiten ließ sich nicht feststellen. Nach MAURER (25) sollen meist jedoch hohe Feldstärken und kurze Trennzeiten bessere Auflösungen liefern. Wegen der dabei nicht unerheblich auftretenden Joule'schen Wärme führten wir die Elektrophorese bei einer Temperatur von + 4° C durch.

5) Färbung und Fixierung

Unmittelbar nach der Elektrophorese entfernt man die zylindrischen Gele aus den Röhrchen. Sie werden dann zur Färbung und Fixierung etwa 10 Min. in einer 0,25 %igen Amidoschwarzlösung (5 Teile Methanol, 4 Teile Wasser und 1 Teil Eisessig) aufbewahrt. In dem gleichen Gemisch ohne Amidoschwarz werden sie weitere 10 - 15 Minuten entfärbt. Der bestehende Farbstoffüberschuß wird in einer 7 %igen Eisessiglösung schließlich noch ausgewaschen. Dieser Vorgang nimmt einige Tage in Anspruch.

Bei unseren Versuchen wendeten wir auch die Färbemethode mit Coomassie Brilliant Blau mehrfach an. Der Arbeits- und Zeitaufwand ist aber bei dieser Methode weit größer. Auch konnten wir damit keine besseren Ergebnisse erzielen. Außerdem liefert das Coomassie nach MAURER (25) zwischen eng beieinanderliegenden Banden einen erhöhten Farbstoffuntergrund, was sich auf die visuelle und densitometrische Auswertung nachteilig auswirkt.

b) Vorversuche

1) Gleichmäßige Gelpolymerisation

Bei der Durchführung unserer Versuche nach obiger Beschreibung erhielten wir besonders für das Trenngel sehr kurze Polymerisationszeiten (2 - 5 Min.). Meist löste sich nach der Polymerisation das Gel von der inneren Röhrchenwand, so daß es während der Elektrophorese ins Anodengefäß herausglitt. Sehr häufig zeigte sich auch beim Entfärben, daß das Protein nahe an der Außenseite des Gels sehr schnell durchgewandert war, ohne sich in charakteristischer Weise aufzutrennen. In diesen Fällen war meist nur ein gleichmäßiger, dünner Streifen durch das ganze Gel zu sehen. Um die Polymerisation zu verlangsamen und damit für einen gleichmäßigen und standardisierten Vorgang zu sorgen, gaben wir zur Lösung F anfangs 0,5 mg, später 0,8 mg $K_3Fe(CN_6)$ pro 8 ml Gesamtlösung. Weiterhin verwendeten wir alle unsere Lösungen nicht bei Raumtemperatur, sondern bei + 4° C. Auf diese Weise ließen sich die Bedingungen so standardisieren, daß die Gellösungen in circa 30 Min. gleichmäßig polymerisierten. Auch haftete das so erhaltene Gel weit besser an der Röhrcheninnenwand.

2) Wahl eines geeigneten Puffersystems

Wie ORNSTEIN (26), DAVIS (9), WILLIAMS u. REISFELD (36) feststellten, ist die Wahl des Puffersystems von wesentlicher Bedeutung für die Auftrennung.

Wir benützten anfangs einen mit NaOH auf pH 8,6 eingestellten 0,01 n Glycinpuffer sowohl zur Herstellung des Gels als auch als Elektrodenpuffer. Dieser Puffer führte jedoch ebenso wie 0,1 n Glycinpuffer und 0,01 n und 0,1 n Phosphatpuffer jeweils vom pH 8,6 nach ca. $2^1/2$ Stunden zu einer starken pH-Wert-Änderung (besonders an der Kathode). Nach 3 Stunden war meist durch Stromabfall die Elektrophorese unterbrochen. Dies verhindert eine scharfe Auftrennung besonders im Globulinbereich. Es zeigten sich meist nur 4 - 5 breite, verwaschene Zonen. Der Versuch mit einem mit Tris auf pH 8,6 eingestellten 0,2 n Glycinpuffer zeigte kaum bessere Ergebnisse. Schließlich verwendeten wir als Elektrodenpuffer 0,1 n Veronalpuffer und zur Herstellung des Gelsystems 0,1 n NaOH-Glycinpuffer (jeweils pH-Wert 8,6).

Bei Gebrauch des Veronalpuffers zeigte sich, daß er selbst bei mehrmaligem Gebrauch (3 - 4 x) seinen pH-Wert kaum ändert und eine gleichmäßige Elektrophorese gewährleistet. Die Aufspaltung der Globuline ließ sich dadurch wesentlich verbessern.

3) Versuch einer besseren Auftrennung durch einen pH-Gradienten zwischen Sammel- und Trenngel

In Anlehnung an die Theorie der Disk-Elektrophorese von ORNSTEIN (26) und DAVIS (9) versuchten wir eine bessere Auftrennung durch Einführung eines pH-Gradienten zwischen Sammel- und Trenngel. Wir stellten hierbei aber sehr häufig eine Substanz-Fällung an der Grenze Sammel-Trenngel mit geringem Auflösungsvermögen fest.

4) Wahl geeigneter Dosierung des Serums

Eine klarere Abgrenzung der einzelnen Fraktionen im Globulinbereich ließ sich durch die Verminderung der aufgetragenen Serummenge von 10 Mikroliter auf 5 - 3 Mikroliter erreichen. Es zeigte sich eine bessere Aufspaltung besonders bei eng aneinanderliegenden Fraktionen. In unseren Hauptversuchen verwendeten wir allerdings nach mehreren vergleichenden Versuchen wieder 10 Mikroliter Serum zur Auftrennung, da sich in vielen Fällen oft sehr feine Banden beim Auftragen von 5 Mikroliter visuell und besonders bei der photographischen Darstellung nicht mehr nachweisen ließen. Außerdem erhielten wir unter Verwendung von DMSO auch bei der größeren Serummenge scharf abgegrenzte Fraktionen.

5) Anwendung von DMSO

Bei unseren Versuchen ersetzten wir den von GESTELAND u. STAEKELIN (14) dem Gel zugesetzten 8 molaren Harnstoff durch DMSO, indem wir den Glycin-NaOH-Puffer zur Herstellung des Gels mit DMSO im Verhältnis 10 : 1 mischten.

Im Gegensatz zu Harnstoff ist DMSO auch ohne Vorbehandlung verwendbar, da es chemisch rein und bei Zimmertemperatur in flüssigem Aggregatzustand vorliegt. Der pH-Wert wird durch DMSO nicht beeinträchtigt. Eine Änderung in der Polymerisation des Gels konnten wir nur bei sehr hoher DMSO-Konzentration (8 molar) feststellen.
Bei diesem Versuch mit 8 molarem DMSO-Zusatz zum Gel war außer der

Polymerisationsveränderung (lange Polymerisationszeit und sehr weiches, klebriges Gel) keinerlei Proteinauftrennung mehr nachweisbar.

Bei der Verwendung von DMSO zeigte sich besonders im Globulinbereich eine wesentlich schärfere Auftrennung und eine Vermehrung der Banden. Da sich aber auch dabei häufig eine Substanzfällung an der Grenze Sammel-Trenngel mit sog. Schwanzbildung zeigte, verzichteten wir versuchsweise auf das Sammelgel. In dieser Versuchsanordnung (Gelsystem I in Tab. I) trennten sich die Fraktionen besser als bei allen anderen Vorversuchen.

Nachträglich ersetzten wir in einigen Versuchen das DMSO durch Mercaptoäthanol (0,001 m). Die Ergebnisse schienen zwar gegenüber der Auftrennung im reinen NaOH-Glycin-Puffer-Polyacrylamidgel etwas verbessert, erreichten aber nicht die Schärfe und Anzahl der Banden im DMSO/Polyacrylamidgel.

c) Hauptversuche

Bei der Durchführung der Hauptversuche verwendeten wir das in Tabelle I als Gelsystem I bezeichnete DMSO-Polyacrylamid-Gel. Zum Vergleich trennten wir parallel jeweils das gleiche Serum ohne DMSO-Zusatz auf. In diesem Fall benutzten wir auch weiterhin ein Sammelgel, da wir in mehreren Versuchen ohne Sammelgel häufig breite, verwaschene Startzonen erhielten. Tabelle I zeigt diese 2 verschiedenen Gelsysteme, mit denen vergleichsweise 27 Normalseren und 53 Seren mit positiven Serumlabilitätsproben aufgetrennt worden sind.

Tabelle I: Die im Hauptversuch verwendeten Gelsysteme

	Gelsystem I mit DMSO	Gelsystem II ohne DMSO	pH
Sammelgel	————	1 Teil D 4 Teile E 1 Teil F	8,6
Trenngel	1 Teil A 6 Teile B 1 Teil C (+ 0,8 mg $K_3Fe(CN_6)$ pro 8 ml Gesamtlösung) unter Zusatz von DMSO zum Glycinpuffer im Verhältnis 1 : 10	1 Teil A 6 Teile B 1 Teil C (+ 0,8 mg $K_3Fe(CN_6)$ pro 8 ml Gesamtlösung) (kein DMSO-Zusatz)	8,6
Elektrodenpuffer	Veronalpuffer	Veronalpuffer	8,6

V. ERGEBNISSE

A. Methodische Vereinfachung:

Da wir bei unserer Methode durch Zusatz von DMSO auch in einem Puffersystem ohne pH-Gradient und ohne Verwendung eines Sammel- und Substanzgels scharfe Fraktionen erhielten, konnte die Arbeitszeit um circa 45 Minuten auf etwa eine Stunde verkürzt und das Verfahren weitgehend vereinfacht werden. Durch den Verzicht auf ein Sammel- und Substanzgel wurde außerdem die recht langwierige Photopolymerisation (circa eine Stunde) unnötig.

B. Anzahl und Schärfe der Banden:

Während wir im Gelsystem I (mit DMSO) eine Auftrennung des Serums bis in 20 Fraktionen erreichten, erhielten wir im Gelsystem II (ohne DMSO) als bestes Trennergebnis nur 14 Fraktionen. In den Tabellen II und III sind die Ergebnisse unserer Versuche einzeln aufgeführt. Dabei wurden nur deutlich sichtbare und abgegrenzte Banden zahlenmäßig ausgewertet. Wie aus dieser vergleichenden Übersicht hervorgeht, war die Anzahl der Fraktionen sowohl bei Normal- als auch bei pathologischen Seren unter Verwendung von DMSO höher. So ergaben sich durchschnittlich bei Auftrennung im Gelsystem I 13,76 Banden bei Normalseren und 12,26 Banden bei den pathologischen Seren, bei Auftrennung im Gelsystem II dagegen nur 8,72 Banden bei Normalseren und 6,94 Banden bei pathologischen Seren (Abb. 2).

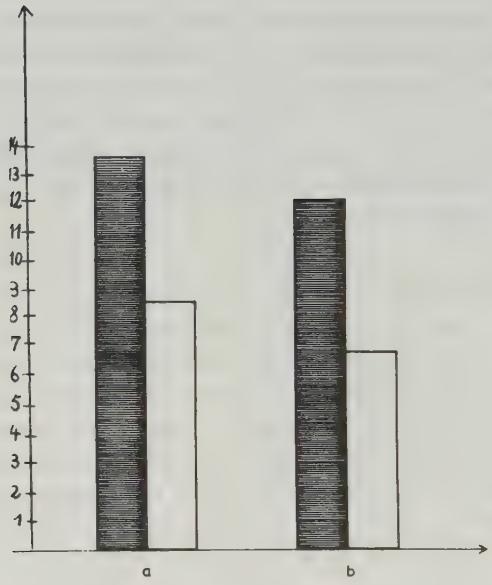


Abb. 2) Vergleichende Übersicht über die durchschnittliche Anzahl der Banden bei Gelsystem I
und Gelsystem II

a) Auftrennung bei Normalseren

b) Auftrennung bei pathologischen Seren

Tabelle II:

Anzahl der Banden - Normalserum

(Auflösung nach CLARKE, ohne Berücksichtigung von Präalbumin)

	Polyacrylamidgel I (mit DMSO)						Polyacrylamidgel II (ohne DMSO)					
Nr.	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ
1	20	2	1	15	1	-	9	2	1	4	1	/
2	14	2	1	9	1	-	11	1	1	7	1	/
3	13	3	1	7	1	-	7	1	1	/	/	/
4	13	3	1	6	1	1	9	2	1	4	1	/
5	18	1	2	13	1	-	8	1	1	/	/	/
6	11	1	1	6	1	-	9	1	1	/	/	/
7	16	1	1	11	1	1	9	2	1	/	/	/
8	19	1	1	15	1	-	9	1	1	/	/	/
9	15	1	1	11	1	-	8	1	1	4	1	/
10	13	1	1	9	1	-	8	1	1	4	1	/
11	12	2	1	7	1	-	7	1	1	/	/	/
12	13	1	1	9	1	-	9	1	2	/	/	/
13	12	1	1	8	1	-	9	1	1	5	/	/
14	11	1	1	7	1	-	8	1	1	4	1	/
15	14	2	1	8	1	1	11	2	1	6	1	/
16	14	2	2	8	1	-	12	1	2	7	1	/
17	15	2	1	9	1	1	9	1	1	4	1	1
18	14	3	1	7	1	1	9	1	2	/	/	/
19	11	1	1	6	1	1	8	1	1	/	/	/
20	11	1	1	7	1	-	8	1	1	/	/	/
21	11	1	2	6	1	-	8	1	1	/	/	/
22	11	1	1	7	1	-	6	1	1	2	1	/
23	11	1	2	6	1	-	5	-	1	2	1	/
24	12	1	2	7	1	-	8	1	1	4	1	/
25	20	2	1	14	1	1	14	2	1	8	1	1
durchschnittliche Anzahl	13,76	1,52	1,20	8,72	1	0,28	8,72	1,16	1,12	/	/	/

/ = nicht sicher auswertbar

Tabelle III:

Anzahl der Banden - Patientenserum

(Auflösung nach CLARKE, ohne Berücksichtigung von Präalbumin)

	Polyacrylamidgel I (mit DMSO)						Polyacrylamidgel II (ohne DMSO)					
Nr.	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ
1	14	3	1	7	1	1	10	2	1	5	1	1
2	10	1	1	4	1	1	6	1	1	/	/	/
3	16	2	2	5	1	5	10	1	1	/	/	/
4	12	2	1	5	1	2	7	1	1	/	/	/
5	13	2	1	5	1	3	6	1	1	/	/	/
6	12	1	1	3	1	5	7	1	1	3	1	/
7	13	2	1	6	1	2	9	1	1	2	1	/
8	12	1	2	2	1	5	7	1	1	3	1	/
9	11	1	1	6	1	1	7	1	1	2	1	1
10	11	1	1	5	1	2	7	1	1	/	/	/
11	16	2	1	6	1	5	7	1	1	/	/	/
12	10	1	2	3	1	2	6	-	1	2	1	1
13	12	1	1	8	1	1	8	1	1	4	1	1
14	11	2	1	3	1	4	6	-	1	2	1	1
15	18	1	1	12	1	2	8	2	1	/	/	/
16	14	3	1	4	1	4	7	1	1	/	/	/
17	10	1	1	4	1	3	6	2	1	/	/	/
18	19	3	1	7	1	6	8	-	1	/	/	/
19	15	1	1	9	1	2	7	-	1	/	/	/
20	8	1	1	2	1	2	8	-	1	3	/	/
21	11	2	2	4	1	1	5	1	1	/	/	/
22	12	2	1	6	1	1	6	-	1	/	/	/
23	14	2	2	8	1	-	6	1	1	/	/	/
24	10	2	1	4	1	1	5	-	1	/	/	/
25	16	2	1	10	1	1	6	1	1	/	/	/
26	14	2	1	8	1	1	7	1	1	/	/	/
27	11	1	1	4	1	3	7	1	1	/	/	/
28	11	2	1	4	1	2	8	2	1	/	/	/
29	12	2	1	5	1	2	6	-	1	/	/	/

Fortsetzung der Tabelle III:

	Polyacrylamidgel I (mit DMSO)						Polyacrylamidgel II (ohne DMSO)					
Nr.	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ
30	15	3	1	7	1	2	7	2	1	/	/	/
31	12	1	1	8	1	-	7	-	1	4	1	/
32	11	2	1	5	1	1	6	-	1	/	/	/
33	11	2	1	6	1	-	8	1	1	/	/	/
34	10	2	1	5	1	-	7	1	1	/	/	/
35	13	1	1	9	1	1	8	1	1	/	/	/
36	10	1	1	5	1	1	6	1	1	/	/	/
37	8	2	1	2	1	1	6	1	1	/	/	/
38	13	1	1	7	1	2	9	1	1	/	/	/
39	13	3	1	5	1	6	7	-	1	/	/	/
40	14	2	1	3	1	6	6	1	1	/	/	/
41	10	2	1	4	1	1	5	1	1	/	/	/
42	13	2	1	7	1	1	8	1	1	/	/	/
43	12	1	2	6	1	1	7	1	1	/	/	/
44	9	2	1	3	1	1	4	-	1	/	/	/
45	10	2	1	4	1	1	7	2	1	/	/	/
46	11	2	1	5	1	1	5	1	1	/	/	/
47	10	3	1	4	1	1	6	1	1	/	/	/
48	12	2	1	7	1	-	8	2	1	3	1	-
49	15	2	1	9	1	1	9	1	1	4	1	1
50	9	1	1	5	1	-	6	1	1	1	1	1
51	14	2	2	7	1	1	8	1	1	3	1	1
52	10	2	1	4	1	1	5	1	1	2	1	-
53	17	3	2	7	1	2	10	2	1	4	1	1
durchschnittliche Werte	12,26	1,77	1,15	5,53	1	1,92	6,94	0,92	1	/	/	/

/ = nicht sicher auswertbar

Um unsere Serumproteinbanden in den beiden von uns verwendeten Gelsystemen besser vergleichen zu können, wählten wir für die folgenden Ausführungen die in Abb. 3 b) dargestellte schematische Zuordnung der einzelnen Fraktionen nach CLARKE (8). Da aber ISICHEI (17) (Abb. 3 a), ORNSTEIN (26) u.a. zu anderen Einteilungen kamen, sei betont, daß wir die Zuordnung der Banden nach CLARKE nur wegen ihrer Übersichtlichkeit für unsere Zwecke vorzogen.

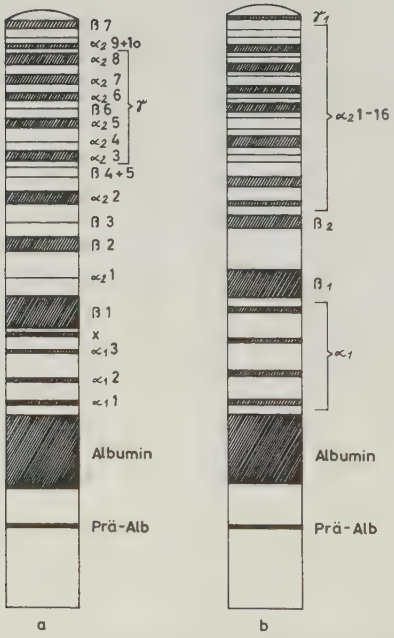


Abb. 3) Schematische Darstellung und Zuordnung der disk-elektrophoretisch getrennten Serumproteinbanden (aus ISICHEI (17))

Einteilung: a) nach ISICHEI

b) nach CLARKE

Die Auftrennung und Schärfe der Banden war in dem Albumin-, α_1- und β-Globulinbereich in beiden Gelsystemen nur unwesentlich verschieden. Bei den als α_2 und γ bezeichneten Banden zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede. Während bei Zusatz von DMSO gerade in diesem Bereich sich scharf abgegrenzte, oft sehr feine und papierblattdünne Fraktionen ergaben (Abb. 5), waren sie im Vergleichsgel ohne DMSO häufig verwaschen, ineinander übergreifend und zahlenmäßig verringert. Sehr oft ließen sie sich auch nicht mehr genau nach dem von CLARKE aufgestellten Schema einordnen, so daß wir sie auch in Tabelle II und III nicht einzeln aufführen konnten. Abb. 4 zeigt das Ergebnis einer Elektrophorese von Normalserum mit und ohne Zusatz von DMSO.

Wie früher schon beschrieben, ließen sich jedoch im α_2-Bereich auch ohne DMSO-Zusatz bei Auftrag einer geringeren Serummenge schärfere und auch mehrere deutlich voneinander abgegrenzte Fraktionen erreichen (durchschnittlich circa 10 Banden). Dennoch ist die Auftrennung im DMSO/Polyacrylamidgel unter unseren Versuchsbedingungen überlegen (vergleiche dazu Vorversuche - Abschnitt 4). Weiterhin ließ sich feststellen, daß sich länger aufbewahrte Seren auch bei DMSO-Zusatz zum Gel schlechter auftrennten. Wir benützten deshalb für unsere Untersuchungen nur höchstens 24 Stunden alte Seren.

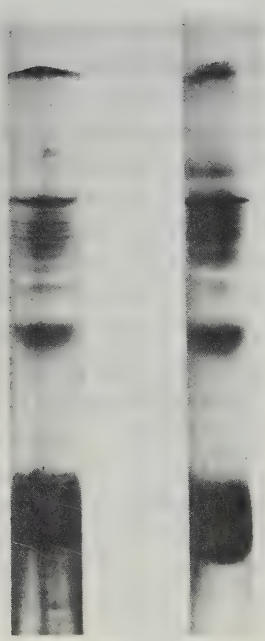


Abb. 4 A)
Pherogramm eines Normalserums

a) Auftrennung im Gelsystem I (mit DMSO)

b) Auftrennung im Gelsystem II (ohne DMSO)

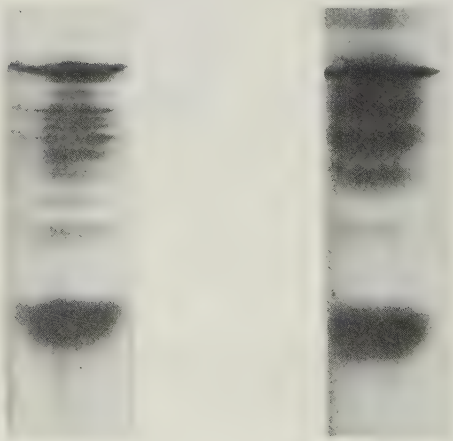
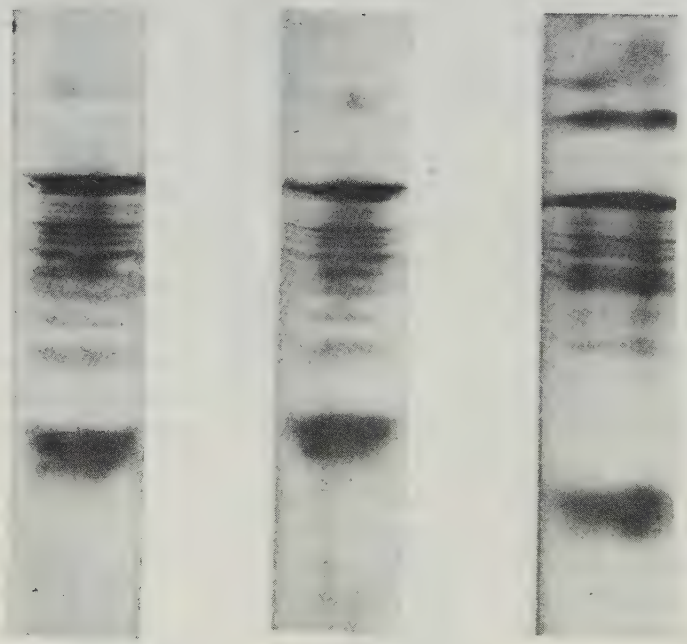


Abb. 4 B) - Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4 A) - zeigt den bei der Disk-Elektrophorese besonders interessanten β, α_2- und γ-Globulinbereich in der unterschiedlichen Auftrennung

In mehreren Versuchen überprüften wir die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse. Dabei zeigte sich, daß nur bei einer Standardisierung aller Versuchsbedingungen sich gut reproduzierbare Proteinmuster darstellen ließen. Besonders gilt dies - wie auf Seite 15 unter Vorversuche, Abschnitt 1 ausgeführt wurde - für die Herstellung des Gels. Unterschiedliche Ergebnisse in Anzahl und Schärfe der Banden beruhen aber nach unseren Erfahrungen auch auf einer ungleichmäßig aufgetragenen Stärkeschicht und auf einer unterschiedlichen Färbe- und Entfärbezeit. Nicht zuletzt ist eine möglichst plane Oberfläche des Gels an der Auftragstelle für vergleichbare Ergebnisse von entscheidender Bedeutung. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren konnten wir eine gute Reproduzierbarkeit unserer Trennergebnisse erzielen. Allerdings stellten wir wie PASTEWKA (27) bei einigen Versuchen eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit identischer Banden trotz gleicher Trennzeit fest. (Vergleiche z.B. die Laufstrecke der β - Bande in Abb. 5 b und 5 c). Auf eine klinische Auswertung des Disk-Elektropherogramms hat aber dies kaum einen Einfluß.

Anzahl und Schärfe der Banden wird nach unseren Beobachtungen nicht zuletzt auch durch die Dauer der Aufbewahrung in der 7%igen Essigsäure mitbestimmt, da sich durch Diffusion der kleineren Proteinmoleküle das Pherogramm verändert. Bei unseren Versuchsbedingungen erwies sich sowohl für die visuelle Auswertung als auch für die photographische Darstellung eine Entfärbezeit von 2 bis 3 Tagen am günstigsten. Zu diesem Zeitpunkt waren nämlich die α_1-Banden, die meist aus 2 oder 3 sehr zarten, diffus angefärbten Zonen bestanden, am deutlichsten zu sehen. Nach circa 8 Tagen waren sie ähnlich wie Präalbumin meist schon aus dem Gel in die Essigsäure diffundiert. Auch die Albuminzone zeigte meist nach längerem Entfärben besonders in ihrem zentralen Bereich eine deutliche Abblassung. Dagegen bleiben die α_2- und β-Banden meist über Wochen unverändert. Im Gelsystem II zeigte sich jedoch in diesem Bereich häufig nach einer sehr langen Aufbewahrungszeit ein klarer abgegrenztes Proteinmuster als zum Zeitpunkt der Auswertung.



a b c

Abb. 5) β -, α_2- und γ -Globulin-Bereich von drei mit der DMSO/Disk-Elektrophorese aufgetrennten Normalseren.
(In Abb. 5 c) deutliche Post- γ -Bande).

C. Neue Banden:

Bei 7 Normalseren und bei 47 pathologischen Seren erhielten wir besonders im Gelsystem I zwischen der von CLARKE als γ_1 bezeichneten Bande und der Auftragstelle weitere meist sehr scharf begrenzte Zonen. Zwar hatte auch CLARKE eine als γ_2 bezeichnete diffuse Bande in einem der Substanzlösung aufgesetzten Gel erhalten (8). Diese Komponente erschien aber als eine zur Kathode wandernde Fraktion und kann daher mit den von uns erhaltenen Banden nicht identisch sein. Auch bei den übrigen Autoren konnten wir keine Beschreibung dieser noch nicht näher zuzuordnenden Fraktionen finden. Während im Gelsystem II nur sehr selten eine solche Bande auftrat, konnten wir im Gelsystem I besonders bei pathologischen Seren bis zu 6 deutliche Fraktionen abgrenzen. (Vergleiche auch Abb. 5 c, 6 b, 7 b,7c und 8 b u. 8 c). Diese Banden waren in wiederholten Versuchen reproduzierber. Im folgenden seien sie ihrer Lage nach als „Post-γ-Banden" bezeichnet.

D. Diagnostische Aussagemöglichkeit:

Da wir, wie schon früher vermerkt, im Gelsystem II die einzelnen Komponenten oft nicht sicher einer bestimmten Globulingruppe zuordnen konnten, seien im folgenden nur die Ergebnisse der Elektrophorese im DMSO-Polyacrylamid-Gel beschrieben:

1) Normalseren

Um eine Aussage über eventuelle typische Veränderungen im Pherogramm bei schweren und chronischen Lebererkrankungen machen zu können, untersuchten wir zunächst 25 Normalseren. Dabei zeigte sich überraschend ein von Serum zu Serum stark wechselndes Auftrennungsvermögen. So erhielten wir im DMSO-Polyacrylamid-Gel zwischen 11 und 20 Fraktionen. CLARKE (8) konnte ebenfalls bei der Untersuchung von 51 Normalseren feststellen, daß bestimmte Fraktionen nicht in allen Seren darzustellen sind. Wie PASTEWKA (27) u. Mitarbeiter, SCHLEYER u. SCHAIBLE (34), DAVID (18) u.a. nachweisen konnten, ist ein wesentlicher Einfluß auf die Anzahl der von uns als α_2 bezeichneten Banden auf den jeweiligen Haptoglobintyp des untersuchten Serums zurückzuführen. Diese unterschiedliche Auftrennung von Normalseren

(Abb. 4 a, 5 u. 6) würde es auch bei unserer Methode erlauben, die einzelnen Pherogramme weitgehend ihrem Haptoglobintyp zuzuordnen.

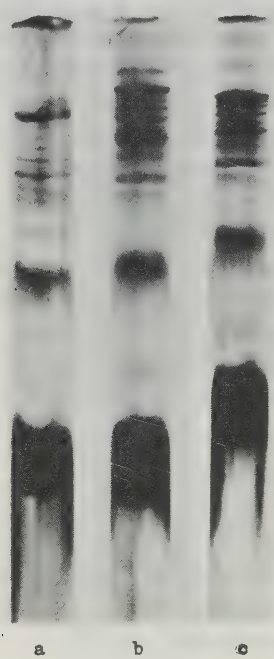


Abb. 6)
DMSO/Disk-Elektropherogramme
von drei Normalseren
mit unterschiedlicher Auftrennung

Im einzelnen konnten wir folgende Fraktionen visuell feststellen: Präalbumin war nur etwa in einem Drittel der Seren sicher als sehr zarte Bande nachweisbar. In zwei Fällen ließen sich jedoch deutlich zwei Zonen vor dem Albumin abgrenzen. Albumin zeigte sich ebenso wie β_1 - das von den meisten Autoren als Transferrinbande bezeichnet wird - in allen Seren als breite, intensiv angefärbte Bande. Dazwischen lagen 1 - 3 sehr zarte, diffuse α_1-Fraktionen. β_2 nach der Transferrinbande war nur in 5 Fällen klar sichtbar. Im α_2-Bereich konnten wir 6 - 15 scharfe, oft papierdünne Zonen feststellen. Die weiter anodisch gewanderten α_2-Banden, die von FELGENHAUER u. Mitarb. (12) als Haptoglobinzone bezeichnet wurde, waren meist etwas diffus und schwächer angefärbt. (Vergleiche auch Abb. 5 u. 6). Immer war die γ-Fraktion, die von ORNSTEIN (26), ISICHEI (17) u.a. als β-Fraktion beschrieben

wurde, als scharfe, intensiv angefärbte Bande nachzuweisen. Nur in 7 Normalseren fanden wir jeweils eine der von uns als neu beschriebenen Post- γ -Banden (Abb. 5 b u. 6 b).

2) Pathologische Seren

Die Auftrennung im Präalbumin-, Albumin-, α_1- und β-Globulinbereich entsprach bei Seren von Leberpatienten allgemein etwa der bei Normalseren. Quantitative Aussagen ließen sich allerdings ohne einen entsprechenden Densitometer nicht machen. Im α_2- und in dem der γ-Bande nachfolgendem Bereich zeigten sich jedoch wesentliche Unterschiede gegenüber den Pherogrammen bei Normalseren. So ließen sich durchschnittlich bei unseren Leberpatienten-Seren im Vergleich zu den Normalseren im α_2-Bereich nur 5,37 gegenüber 8,75, im Post- γ-Bereich dagegen 2,4 gegenüber 0,25 Banden differenzieren. Nach ISICHEI (17) darf jedoch auf Grund der bisherigen Erfahrungen aus dieser Verminderung der α_2-Fraktionen nicht auf ein völliges Fehlen dieser Proteingruppen geschlossen werden. Diese nicht nachweisbaren Banden könnten nämlich auch in niedrigerer Konzentration vorhanden sein. Sie könnten aber ebenso durch die auch bei uns in diesem Bereich besonders bei pathologischen Seren stärker angefärbte diffuse Untergrundbande verdeckt sein. Von ISICHEI (17) u.a. wird diese indifferente Zone dem γ-Globulin zugeordnet. Die Intensivierung dieser Bande bei Erkrankungen mit einem vermehrten γ-Globulin auf dem Papierelektropherogramm würde nach unseren Ergebnissen für diese Annahme sprechen. (Vergleiche Abb. 3 a und Abb. 7 b u. c und Abb. 8 b u. c).

Bei einer vergleichenden Auswertung der Bandenanzahl von Seren bei a) viraler Hepatitis, b) allgemeinem Leberparenchymschaden, c) Leberzirrhose und d) Fettleber mit Seren klinisch gesunder Individuen ergab sich für die einzelnen Erkrankungen folgender charakteristischer Befund:

a) Virale Hepatitis - 12 untersuchte Seren -

Tab. IV:
Anzahl der Banden im DMSO/Disk-Elektropherogramm bei viraler Hepatitis

	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ
1.	12	2	1	5	1	2
2.	12	1	2	2	1	5
3.	11	1	1	5	1	2
4.	10	1	1	4	1	3
5.	15	3	1	7	1	2
6.	11	2	1	5	1	1
7.	11	2	1	6	1	-
8.	10	1	1	5	1	1
9.	8	2	1	2	1	1
10.	10	2	1	4	1	1
11.	13	2	1	7	1	1
12.	12	2	1	7	1	-

Bei allen Pherogrammen vom Typ der viralen Hepatitis ließ sich eine deutliche, wenn auch im Einzelfall unterschiedlich stark ausgeprägte Verminderung der α_2-Globulin-Banden feststellen. Dagegen war die sog. Untergrundbande gegenüber Normalseren deutlich intensiver angefärbt. Diese beiden Befunde decken sich weitgehend mit den Ergebnissen von ISICHEI (17), der drei Hepatitisseren mit dem herkömmlichen Gel-System aus Substanz-, Sammel-, und Trenngel untersuchte. Zusätzlich fanden wir aber noch häufig bei dieser Gruppe nahe der Auftragstelle die früher schon erwähnten neuen sog. Post-γ-Banden. (Vergleiche Abb. 7 b).

b) Allgemeiner Leberparenchymschaden - 13 untersuchte Seren -

Tab. V:

Anzahl der Banden im DMSO/Disk-Elektropherogramm bei allgemeinem Leberparenchymschaden

	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ
1.	14	2	2	7	1	1
2.	9	1	1	5	1	-
3.	11	1	1	6	1	1
4.	16	2	1	6	1	5
5.	10	1	2	3	1	2
6.	11	2	2	4	1	1
7.	10	2	1	4	1	1
8.	12	2	1	5	1	2
9.	10	2	1	5	1	-
10.	13	1	1	7	1	2
11.	10	2	1	4	1	1
12.	11	2	1	5	1	1
13.	15	2	1	9	1	1

In dieser Gruppe faßten wir u.a. Metastasenleber, Morbus Boeck mit Leberbeteiligung, Leberechinokokkus und nicht näher definierte Parenchymschäden zusammen. Im Einzelpherogramm dieser Gruppe zeigte sich meist ein dem Typ der Hepatitis weitgehend entsprechendes Bild: Verminderung der α_2-Globulin- und Vermehrung der Post-γ - Banden bei meist verstärkter Untergrundbande. (Abb. 7 c).

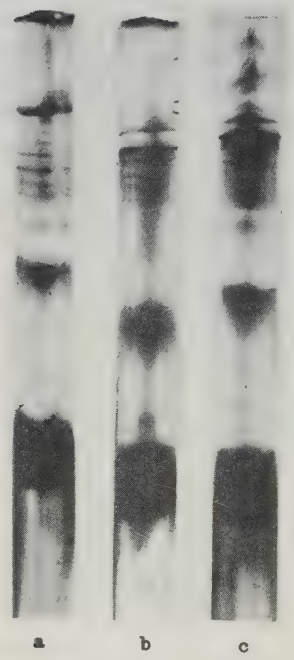


Abb. 7

a) Normalserum
b) Hepatitis
c) Leberparenchymschaden

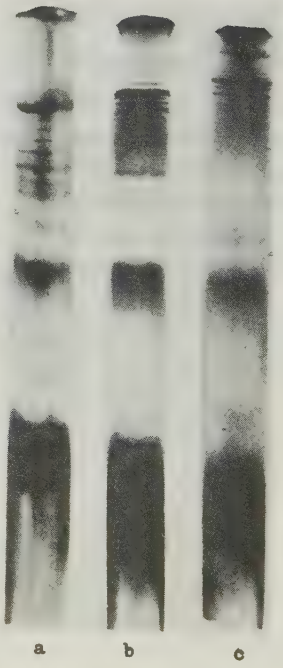


Abb. 8

a) Normalserum
b) und c) Leberzirrhose (beachte die scharf begrenzten Post-γ-Banden)

c) Leber-Zirrhose - 13 untersuchte Seren -

Tab. VI:
Anzahl der Banden im DMSO/Disk-Elektropherogramm bei Leberzirrhose

	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ
1.	10	3	1	4	1	1
2.	10	1	1	4	1	1
3.	16	2	2	5	1	5
4.	12	1	1	3	1	5
5.	11	2	1	3	1	4
6.	19	3	1	7	1	6
7.	15	1	1	9	1	2
8.	8	1	1	2	1	2
9.	11	1	1	4	1	3
10.	11	2	1	4	1	2
11.	13	3	1	5	1	6
12.	14	2	1	3	1	6
13.	10	2	1	4	1	1

Das DMSO-Polyacrylamidpherogramm vom Typ der Leber-Zirrhose zeigte von allen Lebererkrankungen im allgemeinen die stärksten Abweichungen gegenüber der Auftrennung bei Normalseren. Hier war meist die Untergrundbande im α_2-Bereich besonders dominierend. Die α_2-Globuline waren stark vermindert bzw. von der intensiven Untergrundbande maskiert. Auch im Post-γ-Bereich fanden wir hier die weitaus größte Anzahl der neu beschriebenen Banden. (Vergleiche Abb. 8 b u. 8 c). Es ergaben sich aber auch im Einzelfall ähnliche Bilder wie vom Typ der Hepatitis oder der allgemeinen Leberparenchymschädigung. Unsere Pherogramme decken sich, abgesehen von den Post-γ-Banden, auch in dieser Gruppe weitgehend mit den Untersuchungen von ISICHEI (17).

d) Fettleber - 9 untersuchte Seren -

Tab. VII:
Anzahl der Banden im DMSO/Disk-Elektropherogramm bei Fettleber

	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post-γ
1.	14	3	1	7	1	1
2.	18	1	1	12	1	2
3.	12	2	1	6	1	1
4.	14	2	2	8	1	-
5.	14	2	1	8	1	1
6.	12	1	1	8	1	-
7.	12	1	2	6	1	1
8.	9	2	1	3	1	1
9.	17	3	2	7	1	2

Im Pherogramm dieser Gruppe fanden wir die geringste Abweichung gegenüber der Auftrennung von Normalseren. Zwar ließ sich auch hier eine deutlichere Untergrundbande und verminderte Anzahl der α_2-Globulin-Banden feststellen. Die pathologischen Veränderungen waren aber trotz dieser Charakteristika nicht so deutlich ausgeprägt. (Vergleiche Abb. 9 b).

a b

Abb. 9)

a) Normalserum

b) Fettleber

Zu den von uns veröffentlichten Abbildungen, die die Charakteristika der einzelnen von uns untersuchten Seren-Typen veranschaulichen, sei darauf hingewiesen, daß nicht alle Feinheiten photographisch zur Geltung kommen. Das visuelle Bild übertraf vielfach, besonders im α_1- und im α_2-Globulin-Bereich die photographische Darstellung. Auch RAYMOND (29) und andere Autoren betonen, daß sich bei der visuellen Auswertung weit mehr Banden als auf den von ihnen veröffentlichten Abbildungen feststellen ließen.

In der Tabelle VIII ist die unterschiedliche durchschnittliche Bandenanzahl von Seren bei den oben aufgeführten Lebererkrankungen und von Seren klinisch gesunder Individuen vergleichend gegenübergestellt. Dabei wird deutlich, daß für eine diagnostische Auswertung der α_2- und der Post- γ -Bereich besonders aussagekräftig ist.

Tab. VIII:
Durchschnittliche Bandenanzahl bei Lebererkrankungen und bei klinisch gesunden Individuen

Diagnose	gesamt	α_1	β	α_2	γ	Post- γ
Hepatitis	11,25	1,75	1,08	4,92	1	1,59
Parenchym-schaden	11,69	1,69	1,23	5,38	1	1,38
Zirrhose	12,31	1,69	1,08	4,38	1	3,38
Fettleber	13,55	1,78	1,33	7,22	1	1
Normalserum	13,76	1,52	1,20	8,72	1	0,28

Es muß aber betont werden, daß unsere visuelle Auswertung nur einen groben Überblick geben kann. Eine quantitative Auswertung mit sicher weitaus größerer diagnostischer Aussagekraft ist nur mit Hilfe eines speziell entwickelten Densitometers (12; 28) möglich. Auch sollen diese wenigen Werte nur die diagnostische Aussagekraft beweisen, ohne eine statistisch breit angelegte Reihenuntersuchung ersetzen zu wollen.

VI. DISKUSSION

Für die Klinik besteht immer wieder das Problem, Serumeiweißkörper mit möglichst einfachen Methoden soweit als möglich aufzutrennen und das Serumeiweißbild für die Diagnostik bestimmter Krankheitsbilder noch mehr auszunützen. Papier- und Immuno-Elektrophorese sind heute bekannte und weit verbreitete Methoden, deren Bedeutung unbestritten ist. Neuere Methoden wie Stärke-Gel und Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese haben in die Klinik außer für wissenschaftliche Zwecke kaum Eingang gefunden. Grund dafür ist das relativ komplizierte und langwierige Verfahren, welches die breite Anwendung dieser sehr vorteilhaften und in der Aussagekraft sicher weit überlegenen Methode verbietet.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die komplizierte Methodik der Disk-Elektrophorese durch erstmalige Anwendung des stark polaren Lösungsmittels Dimethylsulfoxid soweit zu vereinfachen, daß das Verfahren auch für klinische Routineuntersuchungen anzuwenden ist. Durch die auf Seite 10 ff. beschriebene Wirkung von DMSO auf Eiweißkörper war es möglich, auch bei weitgehender methodischer Vereinfachung eine scharfe Auftrennung der Plasmaproteine zu erreichen. Schon früher hatte man durch entsprechende Vorbehandlung von Eiweißkörpern (Brechen der Wasserstoff- oder S-S-Brücken durch Harnstoff oder Mercaptoäthanol) versucht, eine differenziertere Auftrennung der Proteine zu erreichen (2). So konnten z.B. EDELMANN u. POULIK (11) in einem Stärkegel, dem 8 molarer Harnstoff beigemischt war, Eiweißkörper in mehrere Untereinheiten auftrennen. Auch bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese läßt sich nach BLOEMENDAL (4) u. a. durch Harnstoffzusatz zum Gel eine verbesserte Auftrennung nachweisen. Da aber Harnstoff vor der Verwendung zunächst deionisiert werden muß, ist dieses Verfahren für eine möglichst einfache Routinemethode in der Klinik zu umständlich. Auch konnten wir bei unseren Vorversuchen bei einer probeweisen Anwendung von Harnstoff die späteren Ergebnisse im DMSO/Polyacrylamidgel nicht erreichen.
Zu den Vorzügen der einfachen Anwendung von DMSO kommt noch, daß es - wie schon früher ausgeführt - nur durch Dehydration ohne Veränderungen der Proteinstruktur auf die Eiweißkörper wirkt (22). Dadurch sind die in der DMSO/Disk-Elektrophorese aufgetrennten Proteine noch für weitere immunologische Untersuchungen brauchbar.

BROOME (6) hatte ebenfalls versucht, die Disk-Elektrophorese wesentlich zu vereinfachen. Er ersetzte zu diesem Zweck das Antikonvektions- und Sammelgel durch eine 1 cm hohe Säule eines Puffer-Sephadex-Zuckergemisches. Da er auf diese Weise - wie wir auch - nur noch das Trenngel herstellen mußte, konnte er die ursprüngliche Arbeitszeit von 2 Stunden auf 70 Minuten verkürzen. Jedoch veröffentlicht er keine Zahlenangaben von aufgetrennten Fraktionen bei dieser Methode. Auf einer von ihm publizierten Abbildung lassen sich 10 Zonen abgrenzen. Diese Banden sind besonders im α_2-Bereich nicht so scharf abgegrenzt, wie sie es in Abbildungen von ORNSTEIN (26) und DAVIS (9) oder in Abb. 4 a und Abb. 5 in dieser Arbeit sind. Die Auftrennung entspricht nach der von ihm veröffentlichten Photographie mehr unseren Trennergebnissen ohne DMSO-Zusatz (Abb. 4 b). Für diagnotische Aussagen ist aber außer der Vielzahl der Banden ein möglichst deutliches Proteinmuster besonders im α_2-Globulin-Bereich erforderlich.

Das für eine differenziertere klinische Auswertung entscheidende hohe Trennvermögen der Disk-Elektrophorese wird besonders deutlich, wenn man sich das vertraute Papier-Elektropherogramm vergegenwärtigt. Während die Papier-Elektrophorese die fünf sog. klassischen Serumproteine erfaßt, trennt die Polyacrylamidgel-Elektrophorese in unserer Modifikation bis zu 20 visuell deutlich abgrenzbare Banden auf. Dieser Vorteil wird es nach einer statistisch breit angelegten Untersuchung sicher gestatten, besondere Verschiebungen der Unterfraktionen für die Diagnose auszuwerten. Dies gewinnt besonders noch an praktischer Bedeutung, da man im Papier-Elektropherogramm nicht bei allen Erkrankungen charakteristische Serumeiweißbilder erhält, zumal verschiedene Krankheiten ähnliche Bilder zeigen. (RIVA (32)). Wie WRIGHT und MALLMANN (37) mit der sog. differentiellen Disk-Elektrophorese (zwei oder mehrere übereinander polymerisierte Trenngele mit nach oben abnehmender Polyacrylamidkonzentration) zeigen konnten, läßt sich Human-Serum im Acrylamid-Gel bis in 44 - 55 Komponenten auftrennen. Diese Methode dürfte aber für die Klinik kaum von Bedeutung sein, da der Arbeitsaufwand zu langwierig ist und sich bei der Zuordnung der Banden noch größere Schwierigkeiten ergeben.

Bei der von uns verwendeten DMSO-Polyacrylamid-Elektrophorese ist das Auflösungsvermögen annähernd dem der Immuno-Elektrophorese gleich. In der Übersichtlichkeit der Banden übertrifft sie aber das Bild der Immuno-Elektrophorese. Abgesehen davon ist nach GRABAR (15 b) die Kombination von Elektrophorese und immuno-chemischem Untersuchungsverfahren sehr stark von dem jeweilig verwendeten Anti-Serum abhängig. Dies gestattet bei der Immuno-Elektrophorese nur eine sehr ungenaue quantitative Auswertung. Gerade jedoch die Möglichkeit zur genauen quantitativen Erfassung einzelner Proteine bei einem der Immuno-Elektrophorese gleichkommenden Auflösungsvermögen bereitet den größten Vorteil der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (FELGENHAUER u. Mitarb. (12)). Außerdem bietet sie nach Untersuchungen von ISICHEI (17) eine bessere Reproduzierbarkeit, da sie nicht wie die Immuno-Elektrophorese von biologisch-immunologischen Zufällen abhängt.

Die Vorzüge gegenüber der Stärkegel-Elektrophorese liegen hauptsächlich in der Verwendung des reinen, synthetisch hergestellten Trägerstoffes (4, 7, 17, 25, 26, 30, 31). (Vergleiche Seite 8).

Obgleich nach MAURER (25) und ISICHEI (17) diese Vorteile der Disk-Elektrophorese das Verfahren für die Routine-Diagnostik geeignet erscheinen lassen, treten heute noch Schwierigkeiten bei der exakten Deutung der Proteinmuster auf. So gelingt es noch nicht, die Anordnung der Banden befriedigend und übereinstimmend zu interpretieren. Nach ORNSTEIN (26), DAVIS (9) und PASTEWKA u. Mitarb. (27) sind im normalen Serumbild Präalbumin, Albumin, Postalbumin, Transferrin und die multiplen Haptoglobine leicht zu identifizieren, während sich die γ-Globuline als eine breite Zone vom Trenngel-Startpunkt bis zum Transferrin verteilen. β_1-Lipoprotein findet sich nach diesen Autoren an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel, dann folgt als nächste stärker angefärbte Proteinbande (in Trennrichtung) S-α_2-Globulin; dazwischen verteilen sich Haptoglobine vom Typ 2-2. Nach S-α_2-Globulin schließen sich dann 7s-γ-Globuline, andere Haptoglobine und nicht näher charakterisierte Globuline bis zum Transferrin an. Diese Angaben, verglichen mit denen von ISICHEI (17) und CLARKE (8) (Abb. 3) veranschaulichen die Schwierigkeit einer einheitlichen Zuordnung. Da die einzelnen Proteine trotz guter Reproduzierbarkeit der Muster verschieden weit wandern (PASTEWKA u. Mitarb. (27)

- vergleiche auch Abb. 5 -), wird zur Auswertung als Bezugsystem häufig die Transferrinbande gewählt.

Bei der Deutung der einzelnen Banden liegen also bislang die Grenzen der Disk-Elektrophorese; hier eröffnen sich aber auch nach MAURER (25) der Diagnostik und der Therapie-Kontrolle viele Möglichkeiten. Voraussetzung für eine aussagekräftige Auswertung der einzelnen Fraktionen ist eine breit angelegte Reihenuntersuchung, bei der nicht nur die elektrophoretischen Trennbedingungen, sondern auch die Gewinnung und Behandlung der Untersuchungsmaterialien sorgfältig standardisiert sein muß. Mit der vorliegenden Arbeit ist eine einfache Arbeitsgrundlage für eine solche statistisch gesicherte Untersuchung gegeben.

Bei einer klinischen Anwendung der Disk-Elektrophorese konzentriert sich das wachsende Interesse auf Proteinmuster bei Dys- und Para-Proteinämien. Wie Arbeiten von ZINGALE u. Mitarb. (40), HAMMACK u. Mitarb. (16), KOCHWA u. Mitarb. (19) und anderen gezeigt haben, erweist sich die Disk-Elektrophorese als eine nützliche zusätzliche Methode für die Differentialdiagnose. So konnten typische Pherogramme für Schizophrenie (33), nephrotisches Syndrom (17), cystische Pankreasfibrose (8), akute und chronische Entzündungen (17) und einige Lebererkrankungen ermittelt werden. Allerdings liegen gerade bei Seren von Leberpatienten nur einige wenige Untersuchungen von ISICHEI (17) und MOGI vor. ISICHEI führte die Disk-Elektrophorese im Prinzip nach RAYMOND (29) unter Verwendung eines 3-schichtigen Gelsystems (Substanz-, Sammel-, Trenn-Gel) durch. Trotz wesentlicher methodischer Unterschiede (Gelkonzentration, Puffersystem, Serummenge) sind unsere Ergebnisse bei Hepatitis und Leberzirrhose, abgesehen von den bei uns neu auftretenden Post-γ-Banden, den von ISICHEI veröffentlichten Pherogrammen sehr ähnlich. Die von uns beschriebene Verminderung der Bandenanzahl im α_2-Bereich und die intensivere Anfärbung der Untergrundbande stimmt mit den Ergebnissen von ISICHEI überein. Auch das von MAURER (25) veröffentlichte Disk-Elektropherogramm eines Serums bei Leberzirrhose (nach Untersuchungen von MOGI) zeigt diese typischen Befunde.

Demnach zeigen schon die wenigen vorliegenden Vergleichsuntersuchungen an Seren von Leberpatienten, daß die Disk-Elektrophorese auch in der von uns vorgeschlagenen methodisch einfachen Form eine weitere

Hilfe für die Erkennung chronischer und schwerer Lebererkrankungen bietet. Untersuchungen an einem viel größeren Krankengut werden zu beweisen haben, welche und wie weite Schlüsse aus der Auftrennung und der Zahl der Eiweißfraktionen hinsichtlich der Leberveränderungen zu ziehen erlaubt sind. An der Aussagekraft besteht bereits jetzt kein Zweifel mehr.

Methodisch ist festzustellen, daß die Disk-Elektrophorese eine Verfeinerung der bisherigen Verfahren darstellt, ohne diese jedoch auszuschließen. So hat die Disk-Elektrophorese schon heute z.B. bei der Identifizierung der Hapto-Globin-Typen besonders in der forensischen Medizin eine praktische Bedeutung (13, 34). In der Klinik wäre auf Grund eines auffälligen Papier-Pherogramms als zweiter Schritt die Polyacrylamid-Elektrophorese zu empfehlen, um damit eine weitere Aufspaltung der Eiweißkörper zu erreichen.

Die von FASOLD entwickelte Möglichkeit, in zusammengesetzten Röhrchenhälften das Gel zu polymerisieren, erlaubt es, nach der Elektrophorese den Gelzylinder der Länge nach zu spalten, durch Anfärben der einen Hälfte die Proteine zu isolieren, durch Verwendung der anderen Hälfte in unterteilten Partikeln dann fraktionsgerechte immunologische Untersuchungen anzustellen (Immuno-Elektrophorese, Ochterlony-Test). Denn die Serum-Eiweißkörper werden durch die DMSO-Disk-Elektrophorese in ihrer chemischen Eigenschaft nicht verändert und behalten somit auch ihre immunologischen Potenzen (22).

Zusammenfassend läßt sich deshalb feststellen, daß die DMSO-Polyacrylamid-Elektrophorese nicht nur für klinische, sondern auch für experimentelle und klinisch-chemische Fragestellungen eine breite und noch weiter zu erschließende Möglichkeit eröffnet.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

A. Durch erstmalige Anwendung des stark polaren Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) konnte das übliche Verfahren der Disk-Elektrophorese vereinfacht werden. Es ließen sich durch Elektrophorese im DMSO-Polyacrylamid-Gel nach obiger Beschreibung auch ohne Sammelgel und in einem Puffersystem einheitlichen pH-Wertes bis zu 20 scharf begrenzte Fraktionen im Humanserum auftrennen.

B. Es wurden 25 Seren klinisch gesunder Individuen und 53 Seren mit positiven Labilitätsproben vergleichsweise in einem Gelsystem mit und ohne DMSO-Zusatz aufgetrennt. Dabei zeigten sich besonders im α_2-Bereich unter Verwendung von DMSO mehrere und weit schärfere Banden. Weiterhin ließen sich bei der von uns angewandten Methode bisher noch nicht beschriebene Banden im Gel nach der γ-Region nahe der Auftragstelle reproduzierbar isolieren. Da sie besonders in pathologischen Seren vermehrt auftraten, dürfte ihnen eine diagnostische Aussagekraft zukommen.

C. Bei der visuellen Auswertung der Pherogramme von klinisch gesunden Individuen und von Leberpatienten mit a) viraler Hepatitis, b) allgemeinem Leberparenchymschaden, c) Leberzirrhose und d) Fettleber ergab sich folgendes Ergebnis:

I. Unterschiedliche Auftrennung von Normalseren und damit eine bessere Differenzierungsmöglichkeit (z.B. zur Einteilung von Haptoglobintypen).

II. Im Vergleich zum Normalserum-Pherogramm zeigte sich bei den pathologischen Seren allgemein:
a) eine verminderte Anzahl von α_2-Globulin-Banden,
b) eine Intensivierung der Untergrundbande im α_2-Bereich und
c) eine vermehrte Anzahl von den neu beschriebenen Post-γ-Banden.
Diese drei Kriterien waren besonders bei Leberzirrhose-Seren ausgeprägt, am wenigsten bei Fettleber-Seren.

D. Für eine breit angelegte und statistisch gesicherte Reihenuntersuchung über Zuordnung der einzelnen Fraktionen und charakteristische

Beziehungen zwischen Pherogramm und klinischem Befund ist die DMSO-Polyacrylamidelektrophorese nach den vorliegenden Ergebnissen sicherlich geeignet. Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen stützen die Annahme von MAURER und ISICHEI, daß die Disk-Elektrophorese für Diagnose und Therapiekontrolle nach einer statistisch gesicherten Voruntersuchung eine weitere wertvolle Hilfe in der Klinik sein wird.

Herrn Professor Dr. med H. F r a n k e danke ich für die Übernahme des Referates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. L. M a i w a l d für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Ratschläge und für seine stets freundliche und verständnisvolle Hilfsbereitschaft.

Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. H. F a s o l d danke ich für die Förderung der Arbeit durch viele wertvolle Hinweise und für den Arbeitsplatz am Physiologisch-chemischen Institut.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BERMES, E.W.
H.J. Mc DONALD:
A Practical Experimental Method for Converting Electrophoretic Mobilities in Paper-stabilised Media to Free Solution Values.
J. of Chromatogr. 4 (1960) 34.

2. BIEL, H.,
N. HEIMBURGER,
D. KRAFT,
Th. KRANZ,
R. SCHMIDTBERGER:
Einige neuere analytische Methoden zur Charakterisierung der Plasmaproteine.
Behringwerk-Mitteilung 43 (1964) 1.

3. BLOEMENDAL, H.:
Zone Electrophoresis in Blocks and Columns.
Elsevier Publishing Company 1963.

4. BLOEMENDAL, H.
J.F. JONGKIND,
J.H. WISSE:
Polyacrylamide: een nieuw stabilisirend medium voor zone-elektrophorese.
Chem. Weekblad 58 (1963) 501.

5. BLOEMENDAL, H.:
Zone-elektrophorese: De toepassing van enkele recente snelle scheidingsmethoden.
Chem. Weekblad 59 (1963) 281.

6. BROOME, J.:
A Rapid Method of Disk-Elektrophoresis.
Nature 199 (1963) 179.

7. CARPENTER, E.L.,
H.S. DAVIS:
Acrylamide. Its Preparation and Properties.
J. appl. Chem. 7 (1957) 671.

8. CLARKE, J.T.:
Simplified "Disc" (Polyacrylamide Gel) Electrophoresis.
Ann. New York Acad. Sci. 121 (1964) 428.

9. DAVIS, B.J.:
Disc-Electrophoresis-II. Application to Human Serum Proteins.
Ann. New York Acad. Sci. 121 (1964) 404.

10. DITTMER, A.:
Papierelektrophorese.
Gustav Fischer, Jena 1956.

11. EDELMANN, G.M.,
M.D. POULIK:
Studies on Structural Units of the Gamma-Globulins.
J. exp. Med. 113 (1961) 861.

12. FELGENHAUER, K.,
S. BACH,
A. STAMMLER:
Elektrophorese von Serum und Liquor cerebrospinalis in Polyacrylamid-Gel.
Klin.Wschr. 45 (1967) 371.

13. FERRIS, Th.G., R.E. EASTERLING, R.E. BUDD: Determination of Haptoglobin Types by Electrophoresis in Acrylamide Gel Clin. Chim. Acta 8 (1963) 792.

14. GESTELAND, R.F., T. STAEKELIN: Electrophoretic Analysis of Proteins from Normal and Cesium Chloride-Treated. J. Molekular Biology 24 (1967) 149.

15 a. GRABAR, P., C.A. WILLIAMS: Méthode permettant l' étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d' un mélange de protéins. Application au sérum sanguin. Biochem. Biophys. Acta 10 (1953) 193.

15 b GRABAR, P.: The Use of Immunochemical Methods in Studies on Proteins. Adv. in Protein Chem. 13 (1958) 1.

16. HAMMACK, W.J., B.A. MOORE: The Use of Gel Elektrophoresis in the Diagnosis of the Paraproteinemias. Ann. New York Acad. Sci. 121 (1964) 437.

17. ISICHEI, U.P.: Vergleichende Untersuchungen über Leistungsfähigkeit moderner elektrophoretischer Analysemethoden für die klinische Diagnostik. Med. Dissertation München 1966.

18. JAVID, J.: Haptoglobin 2-1 Bellevue, a Haptoglobin Betta-Chain Mutant. Proc. Nat. Acad. Sci. 57 (1967) 920.

19. KOCHWA, S., E. SMITH, B.J. DAVIS, L.R. WASSERMANN: Abnormal Proteins and Proteins Fractions in Myeloma. Ann. New York Acad. Sci. 121 (1964) 445.

20. KOHN, J.: A New Supporting Medium for Zone Electrophoresis. Clin. Chim. Acta 2 (1957) 297.

21. LEAKE, C.D.: Biologische Wirkung von Dimethylsulfoxid. Zusammenfassung eines Symposiums der New York Academy of Sciences. Dtsch. Med. Wschr. 91 (1966) 2047.

22. MAIWALD, L., K. REGNAT: Über die Trennung von Serumproteinen in Dimethylsulfoxid (DMSO)/Veronalpuffer mit Hilfe der Papierelektrophorese. (In Vorbereitung!)

23. MARTIN, D., A. WEISE, H.-J. NICLAS: Das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid. Angew. Chemie 79 (1967) 340.

24. MATSON, C.F.: Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Annal. Biochem. 13 (1965) 294.

25. MAURER, H.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1968.

26. ORNSTEIN, L.: Disc-Electrophoresis I. Background and Theory. Ann. New York Acad. Sci. 121 (1964) 321.

27. PASTEWKA, J.V., A.T. NESS, A.C. PEACOCK: Electrophoretic Patterns of Normal Human Serums by Disc Electrophoresis in Polyacrylamid Gel. Clin. Chim. Acta 14 (1966) 219.

28. PERT, J.H., L. PINTERIC: Quantitation of Starch Gel Electrophoresis. Ann. New York Acad. Sci. 121 (1964) 310.

29. RAYMOND, S.: A Convient Apparatus for Vertical Gel Electrophoresis. Clin. Chem. 8 (1962) 455.

30. RAYMOND, S., L. WEINTRAUB: Acrylamidgel as a Supporting Medium for Zone Electrophoresis. Science 130 (1959) 711.

31. RAYMOND, S., Y.-J. WANG: Preparation and Properties of Acrylamide Gel for Use in Electrophoresis. Annal. Bioch. 1 (1960) 391.

32. RIVA, G.: Das Serumeiweißbild. Hans Huber, Bern/Stuttgart, 1957.

33. SANDERS, B.E., S.M. SMALL, W.J. AYERS, Y.H. OH, S. AXELROD: Additional Studies on Plasma Proteins Obtained from Schizophrenics and Controls. Transact. N. Y. Acad. Sci. 28 (1965) 22.

34. SCHLEYER, F., P. SCHAIBLE: Darstellung der Haptoglobintypen durch Elektrophorese in Polyacrylamid. Zschr. für klin. Chemie und Biochemie 5 (1967) 32.

35. SMITHIES, O.: Zone Electrophoresis in Starch Gels: Group Variations in the Serum Proteins of Normal Adults. Biochem. J. 61 (1959) 629.

36. WILLIAMS, D.E., R.A. REISFELD: Disc-Electrophoresis in Polyacrylamide Gels: Extension to New Conditions of ph and Buffer. Ann. New York Acad. Sci. 121 (1964) 373.

37. WRIGHT, G.L., W.L. MALLMANN: Differential Disc Electrophoresis of Serum Proteins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123 (1966) 22.

38. WUHRMANN, F., H. MÄRKI: Dysproteinämien und Paraproteinämien. Schwabe & Co., Basel/Stuttgart, 1963.

39. WUNDERLY, Ch.: Die Papierelektrophorese. H.R. Sauerländer & Co., Aarau/Frankfurt a. M., 1959.

40. ZINGALE, S.B., Ch. A. MATTILI, H.D. BOHNER, M.P. BUENO: Disc Electrophoresis Study of Serum Proteins with Multiple Myeloma and Macroglobulinaemia. Blood 22 (1963) 152.

Lebenslauf

Am 6. 12. 1943 bin ich als Sohn des damaligen Forstmeisters Werner Pfeuffer und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Schödel, in Würzburg geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit in Weibersbrunn/Spessart besuchte ich das Hum. Gymnasium je drei Jahre in Aschaffenburg, Regensburg und Ansbach. Im Juli 1963 erwarb ich in Ansbach das Reifezeugnis.

Im Wintersemester 1963/64 immatrikulierte ich mich zum Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg und legte im Herbst 1966 das Physikum ab. Außer einem Auslandsemester in Graz studierte ich bis zum Medizinischen Staatsexamen im Wintersemester 1969/70 auch während der klinischen Ausbildungszeit in Würzburg.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benützt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Eberhard Pfeuffer

DRUCK: BÖHLER KG, 87 WÜRZBURG, Wirsbergstr. 10